

A1

(C) WPI / DERWENT

AN - 1994-002165 [01]

AP - JP19920115877 19920508 JP19920115877 19920508; [Previous Publ. J05308963]

PR - JP19920115877 19920508

TI - Stabilisation of protein molecule - by replacing aminoacid residues with other aminoacid residues in which frequency of anticlockwise spirality of stereo configuration of main chain is high

IW - STABILISED PROTEIN MOLECULAR REPLACE AMINOACID RESIDUE AMINOACID

RESIDUE FREQUENCY ANTICLOCKWISE STEREO CONFIGURATION MAIN CHAIN HIGH

PA - (TANP-N) TANPAKU KOGAKU KENKYUSHO KK

PN - JP5308963 A 19931122 DW199401 C12N9/22 012pp

- JP2902206B2 B2 19990607 DW199928 C12N9/22 011pp

IC - C07K1/00 ; C07K3/08 ; C12N9/22 ; C12N15/09 ; C12N15/55 ; C12P21/00

AB - J05308963 Aminoacid residues of a protein molecule in which the stereo configuration of the main chain is an anticlockwise spiral, and the intra- and intermolecular interactions participated by the side chain of the aminoacid residue are not important for the expression of function of the protein, are replaced by other aminoacid residues in which the frequency of anticlockwise spirality of the stereo configuration of the main chain is high.

- USE/ADVANTAGE - The method can stabilise a protein.

- In an example, a mutant E coli ---RNase--- ---H---, K95G and K95N, were prepd. as follows in which 95-Lys was converted to Gly and Asn respectively. A plasmid pJK95G for expressing mutant ---RNase--- ---H---, K95G was prepd. Ecoli HB101 was transformed by it to give E coli HB101/pJK95G. The mutant ---RNase--- ---H---(K95G) was prepd. using it and purified by a DE-52 column, and a P-11 column. A mutant E COLI ---RNase--- ---H---(K95N) was also prepd. in the same manner. The enzymatic activities and the stabilities of K95G and K95N were examined. Their X-ray crystal structures were also analysed. (Dwg.0/0)

Search statement 2

?

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-308963

(43) 公開日 平成5年(1993)11月22日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/22	Z N A	7823-4B		
C 0 7 K 3/08		7731-4H		
C 1 2 N 15/55				
C 1 2 P 21/00	B	8214-4B		
		8931-4B		
			C 1 2 N 15/00	A
			審査請求 未請求 請求項の数4 (全 12 頁)	

(21) 出願番号 特願平4-115877

(22) 出願日 平成4年(1992)5月8日

(71) 出願人 000149974

株式会社蛋白工学研究所

大阪府吹田市古江台6丁目2番3号

(72) 発明者 木村 成伸

大阪府高槻市古曾部町1-11-12 東レ高

槻アパート112号室

(72) 発明者 石川 弘紀

大阪府箕面市粟生間谷西4-2 箕面粟生

第二住宅34-403

(72) 発明者 中村 春木

大阪府豊中市宮前町1-5-33-402

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

(54) 【発明の名称】 タンパク質分子の安定化法

(57) 【要約】

【目的】 有用なタンパク質の新規安定化法を提供する。

【構成】 左巻きらせん型構造を安定化するよう適切に選択されたアミノ酸残基置換が、タンパク質の安定性を増大させることを見いだし、その方法を大腸菌リボヌクレアーゼHに適用することによって本法の有効性を立証した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 タンパク質分子中のアミノ酸残基のうち、主鎖の立体配置が左巻きらせん型であって、そのアミノ酸残基側鎖が関わる分子内および分子間相互作用が該タンパク質の機能の発現に重要でないアミノ酸残基を、主鎖の立体配置が左巻きらせん型をとる頻度の高い他のアミノ酸残基に置換することを特徴とする安定化したタンパク質分子の製造方法

【請求項2】 左巻きらせん型をとる頻度の高い他のアミノ酸残基がグリシン残基またはアスパラギン残基である請求項1に記載の方法。

【請求項3】 タンパク質分子が大腸菌リボヌクレアーゼHである請求項1に記載の方法。

【請求項4】 天然型大腸菌リボヌクレアーゼHのアミノ酸配列中第95番目のリジン残基をグリシン残基またはアスパラギン残基のいずれかに置換することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、産業上用いられている有用タンパク質の安定性を改良するための方法に関する。

【0002】

【従来技術とその問題点】 酵素等のタンパク質の耐溶解性、耐熱性などタンパク質分子の安定性を高めることはタンパク質を産業上利用する上で極めて有用な結果をもたらすと期待される。タンパク質の安定性を高めるための方法としては、人工的にジスルフィド結合を導入する方法(Wetzel等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 401-405(1988))、イオン対または水素結合の補強(Alber等, Nature, 330, 41-46(1987))、 α -ヘリックスの双極子モーメントの安定化(Nicholson等, Nature, 336, 651-656(1988))、金属イオン結合部位の導入(黒木等、特願平01-077526; Kuraki等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6903-6907(1989))などが報告されている。一般にこれらの方法により安定化をはかろうとする場合にはタンパク質分子の立体構造に基づいて改変するアミノ酸残基を決定するが、タンパク質によってはこれらの方法をうまく適用できるアミノ酸残基が存在しない場合も多く、これらの方法がすべてのタンパク質に対して適用できるというわけではない。したがって、さらに新しい安定化法を開発し、その適用範囲を拡大することが望まれている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 上記の従来技術はいずれも、分子中に新しい相互作用を導入し、タンパク質分子本来の立体構造を補強することによって、その安定性の増大を図るものである。本発明者らは、タンパク質分子が本来含有している不安定化要素、特に主鎖のひずみに着目し、このひずみを解消するような改変をタンパク質分子に加えることによって、その安定性の増大を図り

得ることを見だし本発明を完成したものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 タンパク質分子の主鎖の二面角は制限されており、グリシン以外のアミノ酸残基の主鎖の二面角は折りたたまれたタンパク質分子中では「右巻きらせん型」または「伸展型」とをとっている場合が多く、「左巻きらせん型」は非常に少ない。一方、グリシン残基の場合には、「右巻きらせん型」と「左巻きらせん型」が同程度であることが知られている(Richardson, Advan. Protein Chem, 34, 167-339(1981); Nicholson等, J. Mol. Biol., 210, 181-193(1989))。また、グリシン以外のアミノ酸残基の中ではアスパラギン残基およびアスパラギン酸残基が「左巻きらせん型」をとりやすいことも知られている(Nicholson等, J. Mol. Biol., 210, 181-193(1989))。

【0005】 このように好ましい立体配置がアミノ酸残基の種類によって異なることは、グリシン残基およびアスパラギン残基の「左巻きらせん型」と「右巻きらせん型」の間の構造エネルギー差が、他のアミノ酸残基の場合に比べて小さいためと考えられている。即ち、グリシン残基以外のL-アミノ酸残基では、「左巻きらせん型」は「右巻きらせん型」よりも0.5~2.0 kcal/mol程度エネルギーが高く不安定であるが、グリシン残基ではこのエネルギー差は全くなく(Brant等, J. Mol. Biol., 23, 47-65(1967); Gordon等, J. Am. Chem. Soc., 113, 5989-5997(1991))、またアスパラギン残基では、その短い極性側鎖が残基内で水素結合を作ったり、あるいはタンパク質中の他の部分と相互作用することによってこのエネルギー差を相殺している(Richardson & Richardson, "Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation", Fasman編, Plenum, New York(1989))。したがって、「左巻きらせん型」の二面角を持ち、それゆえにそのタンパク質の不安定化に寄与しているアミノ酸残基を、「左巻きらせん型」をとりやすいアミノ酸残基、例えばグリシン残基またはアスパラギン残基に置換することによって、タンパク質を安定化することができると期待できる。

【0006】 これまでに、「左巻きらせん型」の二面角を持つグリシン以外のアミノ酸残基をグリシン残基に置換した例としては、バクテリオファージT4リゾチームの例が報告されているが、安定性の向上はなされていない(Nicholson等, J. Mol. Biol., 210, 181-193(1989))。しかしこの例ではアミノ酸残基の置換に伴って側鎖間の相互作用にも変化が生じており、このために安定性が向上しなかった可能性も否定できない。したがって本発明の目的のためには、側鎖間の相互作用の変化による不安定化を引き起こさないような変異部位および導入残基を適切に選択することが重要であると考えられる。

【0007】 本発明者らは、上記の観点から、「左巻きらせん型」の二面角をとっている大腸菌リボヌクレアーゼHの第95番目のLys残基に着目し、このアミノ酸残

基を種々のアミノ酸残基に置換した結果、第95番目のアミノ酸残基をグリシン残基またはアスパラギン残基のいずれかに置換することにより耐熱性が向上することを見出し、さらに、グリシン残基またはアスパラギン残基に置換してもこの残基が「左巻きらせん型」を維持しており、しかも主鎖の二面角にほとんど変化がないことを変異酵素のX線結晶解析により確認することによって本発明の有効性を立証した。

【0008】

【詳細な説明】要するに本発明は、タンパク質分子中で主鎖の立体配置が左巻きらせん型であるアミノ酸残基を、主鎖の立体配置が左巻きらせん型をとる頻度の高い他のアミノ酸残基に置換することからなる、タンパク質分子の安定化法を提供するものである。

【0009】本発明の安定化法を適用するアミノ酸残基としては、好ましくは「左巻きらせん型」の二面角をとるグリシン以外のアミノ酸残基であり、より好ましくはグリシンおよびアスパラギン以外のそのようなアミノ酸残基であり、さらに、そのアミノ酸残基の側鎖が他のアミノ酸残基と塩結合、水素結合、疎水結合などの相互作用をしておらず、溶媒中に突き出ている状態のアミノ酸残基が最も好ましい。これは、このような条件を満たすアミノ酸残基の置換が、主鎖のひずみを解消することによってタンパク質の安定化に寄与し、かつ置換によって元のアミノ酸残基側鎖の相互作用による安定化効果を減ずることがないと考えられるからである。

【0010】左巻きらせん型立体配置を持つ上記のようなアミノ酸残基の二面角を大きく変えずにそのひずみを解消するアミノ酸置換としては、主鎖のひずみを解消できるアミノ酸残基への置換であれば何でもよいが、多様な二面角をとりやすいグリシン残基が最も好ましく、またアスパラギン残基も好ましい。

【0011】本発明の方法は、タンパク質分子中の主鎖の立体配置が左巻きらせん型である上述のようなアミノ酸残基を含み、かつそのアミノ酸残基の側鎖がタンパク質中の他の部分と相互作用していなければ、いかなるタンパク質に対してもその安定性を改良するために適用することができると考えられる。

【0012】以下、本発明の具体的な態様として、天然型大腸菌リボヌクレアーゼHの第95番目のリジン残基をグリシン残基またはアスパラギン残基で置換することを特徴とするリボヌクレアーゼHの安定化法について記載する。

【0013】大腸菌の天然型リボヌクレアーゼH(本明細書に於いて単にリボヌクレアーゼHまたはRNaseHと称する場合には、天然型の大腸菌リボヌクレアーゼHを意味するものとする)は155アミノ酸からなる分子量約19Kdの加水分解酵素であって、DNA/RNAハイブリッドのRNA鎖のみを特異的にエンド作用で切断するという基質特異性を有する。この酵素は、その基

質特異性に基づき、下記のような様々な用途を有し、極めて利用価値の高い酵素として注目されている。

1) cDNAのクローニングの際の鋳型mRNAの除去。

2) mRNAのポリA領域の除去。

3) RNAの断片化。

【0014】リボヌクレアーゼHの重要性は遺伝子工学の発展に伴ってますます増大すると思われるが、この酵素は大腸菌内での産生量が極めて低いことから、組換えDNA技術による該酵素の生産が試みられており、既にBRL、ファルマシアおよび宝酒造等から、組換えDNA技術によって生産されたりボヌクレアーゼHが供給されている。これらの市販の組換えリボヌクレアーゼHは、大腸菌を宿主として生産されるものである(金谷等, J.Biol.Chem., 264, 11546-11549(1989))。

【0015】このように利用価値の高いリボヌクレアーゼHの安定性、例えば変性剤や熱に対する耐性を高めることができれば、従来の組換えリボヌクレアーゼHでは利用できなかった条件下での利用が可能となる。

【0016】これまでに、本発明者らは組換えDNA技術を用いて、天然型リボヌクレアーゼHよりも高い安定性を有する変異型リボヌクレアーゼHを製造したが、その安定化の程度は十分満足し得るものではなかった(特願平01-284454、特願平03-197703、特願平03-158332)。また、安定性の改良された変異型リボヌクレアーゼHの中には酵素活性が低下したものもある(特願平03-197707)。また、大腸菌リボヌクレアーゼHよりも極めて高い安定性を有する好熱菌リボヌクレアーゼHの大腸菌による製造法も報告されているが(金谷等、第2回日本蛋白質学会年会プログラム・要旨集(1990)、69頁；特願平02-111065)、大腸菌を用いて生産した好熱菌リボヌクレアーゼHの酵素活性は大腸菌リボヌクレアーゼHよりも低いものであった。さらに、好熱菌リボヌクレアーゼHの場合、精製には尿素を用いて可溶化するという操作が必要であり、大腸菌リボヌクレアーゼHの場合に比べてその製造方法が複雑であるという欠点もあった。したがって、より酵素活性が高く、安定性にすぐれた酵素であって、その製造および精製も好熱菌リボヌクレアーゼHよりも容易である変異型リボヌクレアーゼHをつくることができれば、産業上の利用価値がより高いと考えられる。

【0017】

【発明の効果】上記の目的を達成するために、本発明の方法をその具体的な態様としてリボヌクレアーゼH分子に適用した。本発明に従って改変したりボヌクレアーゼH分子は、その主鎖のひずみの解消によって安定性が増大している事が確認され、これにより、本発明の方法の有効性が立証された。即ち、本法により安定性が高められた変異型リボヌクレアーゼHは、従来のリボヌクレアーゼHでは変性してしまう温度よりも高い温度でさえも変性することがない(実施例3参照)ので、このような条

5

件下での取扱いが可能である。また変異型酵素のX線結晶構造解析の結果(実施例5)は、本発明の方法に従って選択した変異部位(Lys 95)および導入残基(Gly)が、従来技術(変異型バクテリオファージT4リゾチーム、上述)に見られるような問題を伴わない事を明らかにしている。本発明の方法によって作成した変異型リボヌクレアーゼHは、このような熱安定性の向上だけでなく耐変性剤性や耐久性等も向上していると期待され(Pfeil, W.等, "Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology", 349-376頁, Hinz, H.-J. 編, Springer-Verlag, Berlin, 1986; 田村等, 第2回日本蛋白質学会年会プログラム・要旨集(1990), 25頁; Tamura等, Biochemistry, 30(21), 5275-5286(1991)), 従来のリボヌクレアーゼHよりも熱失活しにくく安定に保存することができるので、取り扱いが容易になることは理解されるであろう。

【0018】また、分子内の「左巻らせん型」構造を安定化することによってタンパク質分子を安定化することの特徴とする、リボヌクレアーゼHを用いてその有効性が実証された本発明の方法は、リボヌクレアーゼH以外のタンパク質についても適用可能であることは明らかである。例えば本発明の安定化法を適用することによって安定化できると考えられるタンパク質として、マレートデヒドロゲナーゼ(ブタ心臓)、トリプトファン合成酵素(ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)) α -サブユニットなどがある。マレートデヒドロゲナーゼではリジン238($(\phi, \psi) = (65^\circ, 11^\circ)$)およびリジン294(同 $(59^\circ, 12^\circ)$)、またトリプトファン合成酵素(ネズミチフス菌) α -サブユニットではリジン15(同 $(41^\circ, 68^\circ)$)が、それぞれ「左巻らせん型」の主鎖構造を有しており、しかもタンパク質の他の部分とこれらの残基との相互作用は認められない。したがって、これらの残基のそれぞれまたは一部をグリシン残基あるいはアスパラギン残基に置換することによって、その活性に不利な影響を与えることなくこれらのタンパク質を安定化することが可能と考えられる。またこれ以外のタンパク質分子でも、その立体構造が明らかにされれば、本安定化法が適用できる例は多いと考えられる。

【0019】以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。以下に述べる遺伝子操作の一般的手法は、マニュアル書(Maniatis等, Molecular Cloning(1982): A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory)および試薬の仕様書に従った。

【0020】

【実施例】

実施例1 変異型大腸菌リボヌクレアーゼHの設計

大腸菌リボヌクレアーゼHの立体構造はX線解析により1.48Å分解能で決定されている(Katayanagi等, Nature, 347, 306-309(1990); Katayanagi等, J. Mol. Biol., 223, 1029-1052(1992))。その解析結果によれば、ヘリックス α IIIと α IVをつなぐループ部分にある95位のリジン

6

残基の主鎖の二面角(ϕ, ψ)は($64^\circ, 29^\circ$)であり、「左巻らせん型」の二面角をとっている。また、このループは立体構造上比較的独立した領域を形成しており、溶媒中に突き出ている。Lys 95の側鎖は溶媒中に突き出ており溶媒分子と水素結合を形成しているが、他のアミノ酸残基との相互作用はみられない(図1参照)。通常Lys残基が「左巻らせん型」の二面角をとることはまれである。一方、グリシン残基およびアスパラギン残基はリジン残基よりも「左巻らせん型」の二面角をとりやすいことがすでに知られている(Nicholson等, J. Mol. Biol., 210, 181-193(1989))。そこで、「左巻らせん型」をとりやすいアミノ酸残基に置換することによってタンパク質分子の安定性を改良するために、本酵素の95位のLysをGlyまたはAsnのいずれかに変換した変異型大腸菌RNaseH(それぞれK95GおよびK95Nと命名する)を作成することにした。またこのLys 95を、側鎖が β -メチル基のみであり「左巻らせん型」の二面角をとりにくいAlaに変換した変異型大腸菌リボヌクレアーゼH(K95A)(金谷等, J. Biol. Chem., 266, 11621-11627(1991))についても比較の意味で安定性を調べた。

【0021】実施例2 変異型大腸菌リボヌクレアーゼH(K95G)の作成

変異型リボヌクレアーゼH, K95Gを次のようにして作成した。変異型リボヌクレアーゼII, K95Gを発現するプラスミドpJ K95Gの作成の概略を図2に示す。

【0022】まず、天然型リボヌクレアーゼHの大腸菌での発現プラスミドpAK600(特開平03-065188参照)のrnh遺伝子を鋳型とし、プライマーを用いてPCR法によりrnh遺伝子への点突然変異の導入を行った。

【0023】プライマーとしては、図3に示す化学合成したオリゴヌクレオチドを用いた。図2および図3に示すように、まず、pAK600を鋳型DNAとして、Sph Iの制限酵素部位を含む5'-プライマー(1)と3'-プライマー(4)により約300bpのDNA断片を、また、変異導入用5'-プライマー(3)とSal I部位を含む3'-プライマー(2)により約250bpのDNA断片を、それぞれPCR反応により増幅し、2種類の遺伝子断片を得た。PCR反応は市販のGene Amp Kit(Takara)の説明書に従って行った。得られた約300bpの遺伝子断片を制限酵素Sph IおよびPst Iで、また約250bpのDNA断片を制限酵素Pst IおよびSal Iで消化した後、消化物を1.5%アガロースゲル電気泳動にかけ、それぞれ約300bpおよび約250bpのDNA断片を得た。このうち、約250bp断片には変異導入部位が含まれている。

【0024】次に、このようにして得られた変異遺伝子断片を、大腸菌での発現ベクターにサブクローニングすることによって発現ベクターを作製した。プラスミドpJLA504(ドイツMedac社より購入)をSph Iおよび

Sal I で消化し、約4.9 kbの断片を0.7%アガロース電気泳動により精製した後、上記の約300 bpおよび約250 bp断片からなる変異 rnh 遺伝子Sph I-Sal I断片とライゲーションすることにより環化した。ライゲーションは市販のライゲーションキット(Takara)を用い、添付の説明書に正確に従って行った。このようにして得られたプラスミドで大腸菌HB101株を形質転換し、形質転換体から変異型リボヌクレアーゼH発現用プラスミドベクターpJK95Gを得た。

【0025】上記のようにして得られた形質転換菌エシエリシア・コリ(E.coli)HB101/pJK95Gは工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている(微工研菌寄第12495号、受託日:平成3年9月10日)。

【0026】次に、変異型リボヌクレアーゼH(K95G)の生産と精製を以下のようにして行った。大腸菌形質転換体HB101/pJK95Gを100 $\mu\text{g}/\text{l}$ のアンピシリンを含むLB培地500 ml中、30℃で振盪培養した。培養液の濁度がクレット値で約100まで生育した時点で、培養温度を42℃に上げ、更に3.5時間振盪を続け、次いで遠心して集菌した。この時のクレット値は約250であった。

【0027】得られた菌体を1 mM EDTAを含む10 mMトリス塩酸緩衝液(TE)(pH7.5)15 mlに懸濁した後、水中で超音波処理により菌体を破砕した。15,000 rpmで30分間、4℃で遠心して得た遠心上清(粗抽出液)を、TE(pH7.5)5 lに対して4℃で一夜透析した。透析後の粗抽出液を同緩衝液で平衡化したDE-52カラム(5 ml)およびP-11カラム(2 ml)にこの順序で通した。この条件下で、変異型リボヌクレアーゼH(K95G)はDE-52カラムを素通りし、P-11カラムに吸着した。TE(pH7.5)を4 ml流した後、NaCl濃度を0.5 Mまで直線的に上昇させることによりP-11カラムから変異型リボヌクレアーゼH(K95G)を溶出させた。変異型リボヌクレアーゼH(K95G)を含むP-11溶出面分をまとめ、精製標品とした。精製標品は15% SDS-PAGEで単一バンドを与え、逆相HPLCでも単一ピークを示した。精製収量は54.2 mg/l培養液であった。精製標品の同定は、アクロマクタープロテアーゼIで消化して得られるペプチドフラグメントを、逆相HPLCでマッピングして各フラグメントピークの溶出位置を確認すると共に、95位のアミノ酸残基を含むペプチドを分取後アミノ酸配列分析することによって行った。

【0028】実施例3 変異型大腸菌リボヌクレアーゼH(K95N)の作成

変異型大腸菌リボヌクレアーゼH(K95N)の作成を以下のようにして行った。変異型大腸菌リボヌクレアーゼH(K95N)を発現するプラスミドpJK95Nの作成の概略を図4に示す。pJK95Nの作成は、実施例2で述べたpJK95Gの作成と同様な方法で行った。ただし、pJK95Nの作成では、pJK95Gの作成に用いたオリゴヌクレオチドプライマー(3)のかわりにオリゴヌクレオチドプライマー(5)を用いた(図3参照)。

【0029】得られたプラスミドpJK95Nで大腸菌HB101株を形質転換して、変異型大腸菌リボヌクレアーゼH(K95N)発現用プラスミドを持つ大腸菌株HB101/pJK95Nを得た。この形質転換菌は工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている(微工研菌寄第12706号、受託日:平成4年1月10日)。大腸菌株HB101/pJK95Nを用いて、実施例2に記載した変異型リボヌクレアーゼH(K95G)の場合と同じ方法により目的の変異型大腸菌リボヌクレアーゼH(K95G)を生産し、精製した。精製標品は15% SDS-PAGEで単一バンドを与え、逆相HPLCでも単一ピークを示した。精製収量は51.9 mg/l培養液であった。精製標品の同定は、アクロマクタープロテアーゼIで消化して得られるペプチドフラグメントを、逆相HPLCでマッピングして各フラグメントピークの溶出位置を確認すると共に、95位のアミノ酸残基を含むペプチドを分取後アミノ酸配列分析することによって行った。

【0030】実施例4 変異型大腸菌リボヌクレアーゼHの酵素活性と安定性

実施例2および3で作成した変異型大腸菌リボヌクレアーゼH(K95GおよびK95N)の酵素活性と安定性を、変異型大腸菌リボヌクレアーゼH(K95A)と共に以下のように測定し、天然型酵素と比較した。尚、変異型大腸菌リボヌクレアーゼH(K95A)は金谷らの方法(J. Boil. Chem., 266, 11621-11627(1991))に従って調製したものをを用いた。

【0031】変異型酵素の酵素活性は、 $[\text{H}]$ -M13 DNA/RNAを基質として用い、37℃で1分間に1 μmol の酸可溶性物質を遊離する酵素活性を1ユニット(U)と定義した。タンパク質量は変異型リボヌクレアーゼHが天然型リボヌクレアーゼHと同じ吸光係数を持つという仮定のもとに $\epsilon_{280} = 1576 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて280 nmにおける吸光度を測定することにより求めた。得られた結果を表1に示す。

【表1】

天然型および変異型リボヌクレアーゼHの酵素活性の比較

酵素名	比活性(U/mg)
天然型リボヌクレアーゼH	20
変異型リボヌクレアーゼH(K95G)	23
" (K95N)	19

" (K95A) 19

いずれの変異型リボヌクレアーゼHも天然型酵素とほぼ同等の酵素活性を保持していた。

【0032】次に、天然型リボヌクレアーゼHと変異型リボヌクレアーゼIIの熱安定性について測定し、比較した。測定はpH5.5での変性の割合を220nmにおけるCD値で熱変性曲線を測定することにより行った。熱変性実験は光路長2mmセルを用い、1M塩酸グアニジンお

*および1mMジチオトレイトール(DTT)を含む20mM酢酸ナトリウム(pH5.5)中で行った。熱安定性は全体の50%が変性するときの温度(Tm)で比較した。Tmの測定誤差は67%の有意水準で±0.3℃であった。得られた結果を次の表2に示す。

【表2】

天然型および変異型リボヌクレアーゼHの熱安定性の比較

酵素名	50%変性するときの温度(Tm(℃))
天然型リボヌクレアーゼH	51.9
変異型リボヌクレアーゼH(K95G)	58.7
" (K95N)	55.1
" (K95A)	52.3

【0033】天然型酵素に対し、変異型リボヌクレアーゼK95GおよびK95Nではそれぞれ6.8℃および3.2℃の熱安定性の上昇がみられた。これらの変異体はいずれも本発明の方法に従って、95位の主鎖のひずみを解消する目的で作成した変異体である。左巻きらせん型の二面角をもつ95位のリジン残基を、本発明の方法に従って、リジン残基よりも左巻きらせん型の二面角をとりやすいグリシンまたはアスパラギン残基に置換することによって、予測されたように(実施例1参照)、タンパク質の熱安定性の向上がもたらされた。また本発明の基礎をなす理論から予測され得るように、アスパラギン残基よりも左巻きらせん型をとりやすいグリシン残基に置換した変異体K95Gの方が、K95Nよりも安定化の効果が大きかった。

【0034】これに対し、左巻きらせん型の二面角をとりにくいアラニン残基に置換した変異体K95Aでは熱※30

※安定性が天然型よりも0.4℃上昇したに過ぎず、Tm値の測定誤差を考慮すると有意な安定性の増加は認められなかった。

【0035】実施例5 変異型リボヌクレアーゼH(K95GおよびK95N)のX線結晶構造解析

20 変異型リボヌクレアーゼH(K95GおよびK95N)の立体構造を天然型酵素の立体構造と比較することによって変異による立体構造の変化を明らかにするために、変異型リボヌクレアーゼH(K95GおよびK95N)X線結晶解析を以下のように行った。

【0036】K95GおよびK95Nの結晶を天然型酵素結晶化条件(金谷等, J. Biol. Chem. 264, 11546-11549(1990))に従って行い、天然型酵素と同型の結晶を得た(表3)。

【表3】

天然型リボヌクレアーゼHと変異型リボヌクレアーゼHの結晶の比較

	天然型RNaseHの結晶		変異型RNaseHの結晶	
	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁		K 9 5 G	K 9 5 N
空間群	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁		P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a(Å)	44.06		44.04	44.14
b(Å)	86.85		86.63	87.01
c(Å)	35.47		35.48	35.45

【0037】X線強度の測定はEnraf-Nonius社のCAD4を用いて行い、1.8Åまでのデータを得た。天然型酵素の結晶構造(片柳等, Nature 347, 306-309(1990))の結晶構造を初期構造とし、束縛条件下での最小2乗法による精密化プログラムPROLSQ、及びモデル電子密度適合プログラムFRODOを用いて精密化を行った。最終的に、5.0~1.8Å(F>1.0σ(F))のデータを用いたR値は0.185、結合距離の理想値からのずれの平均2乗の平方根(r.m.s.)はどちらの変異型リボヌクレアーゼHに対しても0.015Åとなった。

【0038】1.8Å分解能で決定した変異型リボヌクレアーゼH(K95GおよびK95N)の結晶構造は、い

40 ずれも変異部位近傍のわずかな構造変化を除いてほとんど天然型酵素と同一であった。変異型酵素の天然型酵素に対する(95位のアミノ酸残基側鎖を除く)全原子の相対的変位のr.m.s.は、K95GおよびK95Nに対してそれぞれ0.284Åおよび0.286Åであった。変異型酵素K95GおよびK95Nの変異部位近傍の結晶構造を第5図に示す。K95GのGly95並びにK95NのAsn95の主鎖の二面角(φ, ψ)はそれぞれ(85°, 9°)および(71°, 40°)であり、「左巻きらせん型」を維持していた。観測されたこのグリシン残基の二面角は、一般にグリシン残基が取り易い二面角でありエネルギー的にも安定であると報告されている値(φ, ψ)

11

$= (90^\circ, 0^\circ)$ (Nicholson等, J. Mol. Biol., 210, 181-193 (1989)) に近い値となっている。また K 95 N の Asn 95 の側鎖アミノ基の N δ 原子は、主鎖のカルボキシル基の酸素原子と水素結合を形成しており (N δ -O 間の距離は 2.7 Å であった)、K 95 N の安定化に寄与していると考えられる。

【0039】これらのX線結晶構造解析結果は、グリシン残基またはアスパラギン残基への置換によって95位の「左巻きらせん型」構造が安定化され、しかもこの置換がタンパク質の立体構造を大きく変化させなかったことを示しており、実施例4で立証された変異型酵素K95GおよびK95Nの安定化が、この「左巻きらせん型」構造の安定化によることが確認できた。

【図面の簡単な説明】

【図1】天然型大腸菌リボヌクレアーゼHの立体構造を示す図である。Aは主鎖のみを示した図であり、Lys

12

95の位置を矢印で示した。BはLys95近傍のループ部分のステレオ図である。破線は水素結合を、黒丸は水分子を表わす。

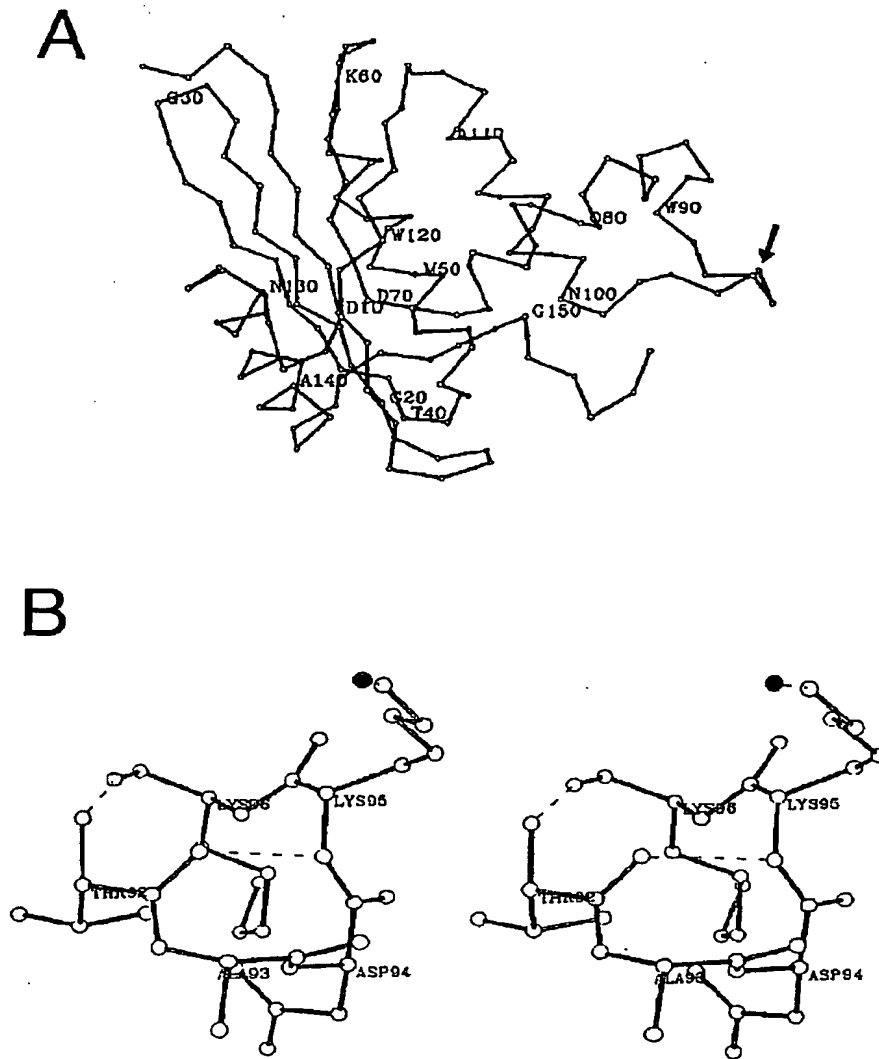
【図2】プラスミドpJK95Gの構築を示す模式図である。

【図3】部位特異的突然変異を導入するための合成オリゴヌクレオチドを示す模式図であり、図中の下線は制限酵素部位を、・印は変異アミノ酸に対応する塩基をそれぞれ示すものである。

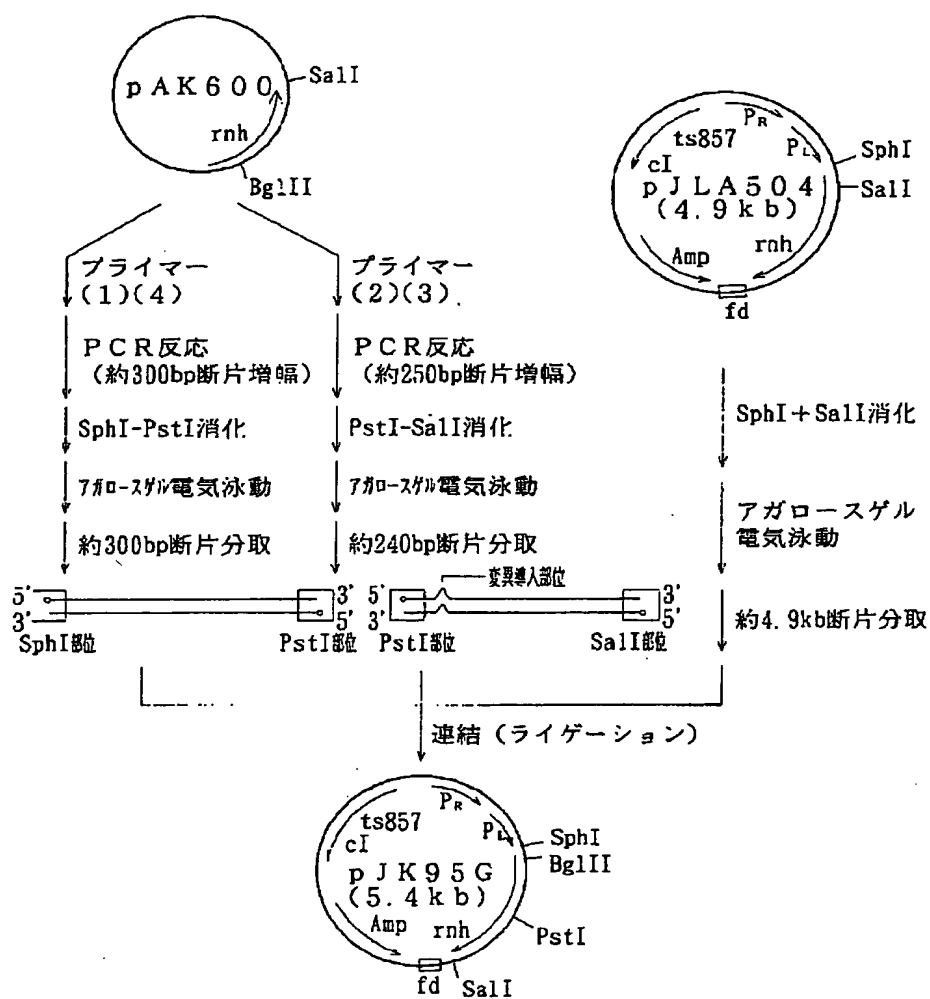
10 【図4】プラスミドpJK95Nの構築を示す模式図である。

【図5】変異型リボヌクレアーゼH(K95GおよびK95N)の立体構造を示す図である。Aは変異型酵素K95Gの95位近傍のループ部分のステレオ図であり、Bは変異型酵素K95Nの95位近傍のループ部分のステレオ図である。破線は水素結合を表す。

【図1】



【図2】



合成オリゴヌクレオチド プライマー	塩基配列	鎖長
(1)	5'-GGGCATGCTTAACAGGTAGAAATTTTC-3' SphI部位	28mer
(2)	5'-GGGTGGACCAATTGCGAGGCGGTGG-3' SalI部位	26mer
(3)	... 5'-GGAAACTGCAGACGGCAACCAAGTAAAAATGTCGATCTCTGG-3' PstI部位	44mer
(4)	5'-CTGGTTTTTGTCTGCAGTTTTCAGCCACG-3' PstI部位	31mer
(5)	... 5'-GGAAACTGCAGACCAACCAAGTAAAAATGTCGATCTCTGG-3' PstI部位	44mer

(10)

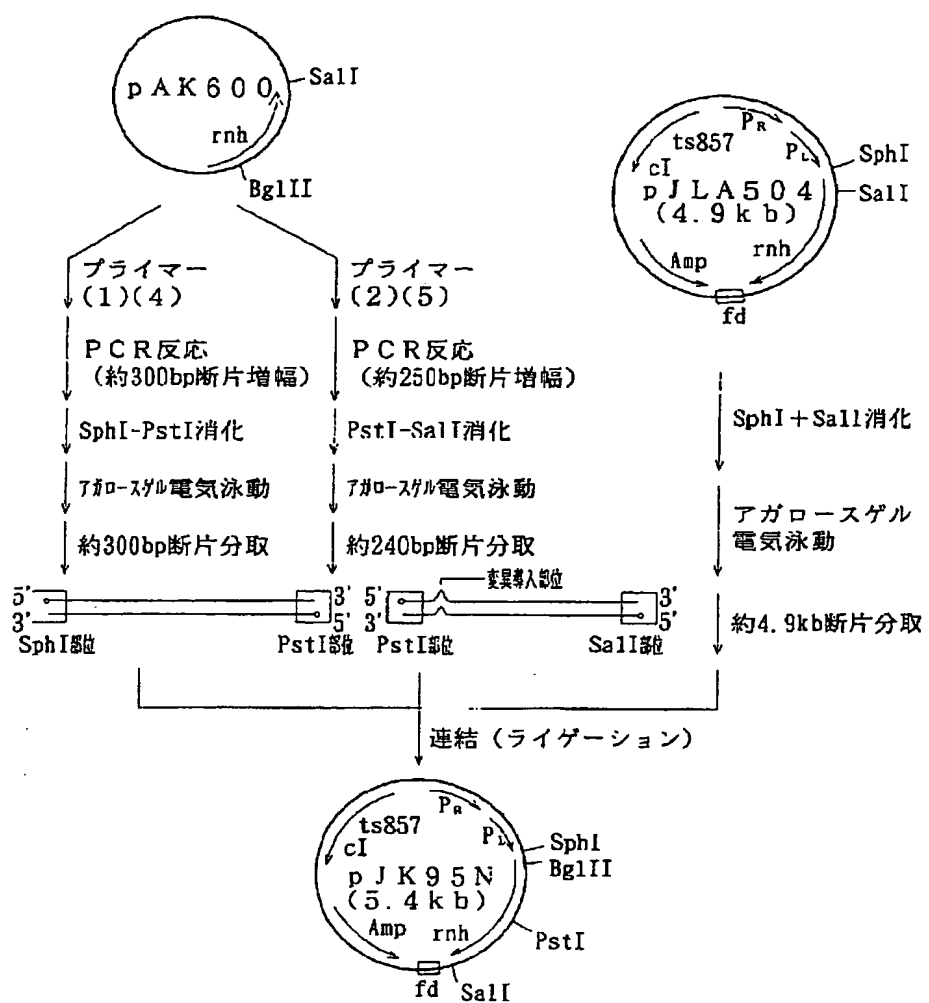
【図3】

制限酵素部位

・ 変異アミノ酸に対応する塩基

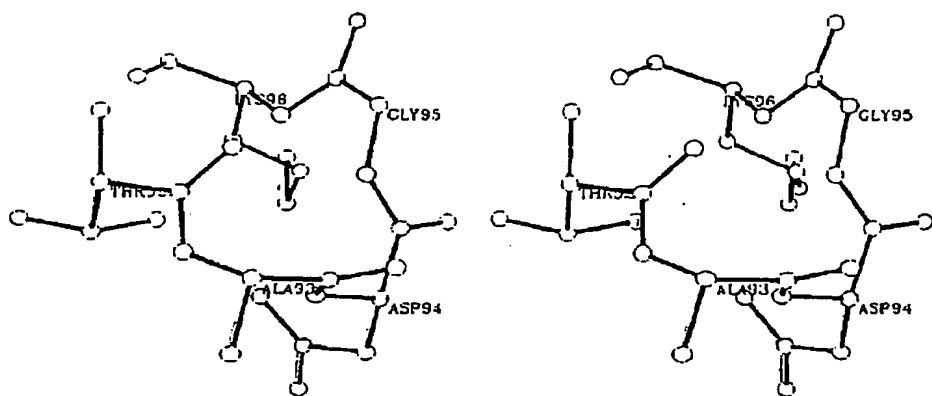
特開平5-308963

【図4】



【図5】

A



B

